

Características fenotípicas útiles para la identificación presuntiva de *Candida guilliermondii*

M.V. PINONI, V. CASTÁN, M.I. MAEGLI, J. LORENZO, F. FRIZZERA,
V. JEWUCHOWICZ, M.T. MUJICA*

Centro de Micología, Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155 (1121) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: mtmujica@gmail.com

RESUMEN

En el medio CHROMagar *Candida*, *Candida guilliermondii* desarrolló una colonia de color rosado-púrpura. En láminas de agar leche-tween 80 al 1%, presentó a las 48 h de cultivo a 28 °C levaduras pequeñas, ovoides y brotantes, de 3 a 5 µm, que no formaron pseudomicelio y que posteriormente desarrollaron un conglomerado característico de pseudohifas con disposición radiada. Estas se encontraron bien desarrolladas a las 96 h de incubación. Los ensayos de asimilación resultaron negativos para la trehalosa y positivos para la sacarosa. Estos hallazgos fueron validados en el 100% de los aislamientos con los métodos automatizados ID 32C y Vitek YBC, los que señalaron a *Candida famata* como segunda opción, con un porcentaje de confianza del 10%. El estudio de la micromorfología de las levaduras aumenta la probabilidad de una identificación correcta, particularmente si se debe discriminar entre especies que presentan perfiles bioquímicos similares.

Palabras clave: *Candida guilliermondii*, micromorfología, CHROMagar *Candida*, *Candida*

ABSTRACT

Useful phenotypic characteristics for presumptive identification of *Candida guilliermondii*. *Candida guilliermondii* developed a pink-purplish colony on CHROMagar *Candida*. In the micromorphology in milk-tween 80 1% agar at 28 °C after 48 h of incubation *C. guilliermondii* showed small (3-5 µm), spherical yeasts without pseudohyphae. This *Candida* species presented a characteristic cluster of blastospores with pseudohyphae radiating from the centre at 96 h. The trehalose-sucrose assimilation assay was applied to the *C. guilliermondii* isolates which proved negative for trehalose and positive for sucrose. These results allowed for the presumptive identification of *C. guilliermondii*. The results were concordant in 100% of the isolates with the identification of the *C. guilliermondii* species by the ID 32C and Vitek YBC methods. Such automated methods offered *Candida famata* as a second option, with a reliability percentage of 10%. Micromorphological studies increase yeast identification reliability, especially among species presenting similar biochemical profiles.

Key words: *Candida guilliermondii*, *Candida* micromorphology, CHROMagar *Candida*, *Candida*

Las especies del género *Candida* constituyen la cuarta causa de sepsis de origen nosocomial (12, 16) y son aisladas de diversos materiales (boca, piel, uñas, genitales y orina). Su identificación resulta esencial en el laboratorio, porque orienta las decisiones terapéuticas y permite realizar mapas epidemiológicos y establecer medidas preventivas frente a brotes intrahospitalarios.

Los métodos tradicionales de identificación de levaduras se basan en la determinación de sus características morfológicas y de sus requerimientos nutricionales, para lo cual se utilizan técnicas artesanales muy laboriosas y que insumen mucho tiempo. Por estos motivos han surgido métodos comerciales, algunos automatizados, basados en la actividad enzimática de las levaduras, los que muestran buena especificidad y reproducibilidad y están facilitando la tarea en el laboratorio de microbiología (1, 6, 7).

Actualmente, la utilización de medios cromogénicos (6, 11, 13), los ensayos de asimilación de azúcares, como trehalosa y sacarosa, y las características micromorfológicas en agar leche-tween 80 al 1% (5) o en agar harina de maíz, permiten la observación de levaduras con diferentes morfologías y resultan útiles en la identificación al sumarlos a criterios bioquímicos o a la observación del color y aspecto de la colonia en el medio CHROMagar *Candida* (5, 6, 8, 14).

La especie *Candida guilliermondii* es una levadura emergente (3) que produce fungemia, osteomielitis y peritonitis, y tiene baja sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B (4, 9, 10, 15). Presenta dos variedades: *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* y *C. guilliermondii* var. *membranifaciens* (2).

Nuestro objetivo fue evaluar la utilidad del medio cromogénico comercial CHROMagar *Candida*, de la ob-

servación de la micromorfología en agar leche-tween 80 al 1% y del estudio del perfil bioquímico frente a trehalosa y sacarosa para obtener un algoritmo económico y confiable que permita la identificación de *C. guilliermondii*.

Se estudió un total de 45 levaduras, de las cuales 35 correspondían a la especie *C. guilliermondii* y eran provenientes de uñas (n=25), sangre (n=5), boca (n=3), piel (n=1) y orina (n=1). Las restantes correspondían a las especies *Candida famata* (n=5) y *Candida glabrata* (n=5), las que comparten características fenotípicas con *C. guilliermondii*. Las identificaciones se realizaron mediante el estudio del perfil bioquímico determinado por dos métodos comerciales, el ID32C (bioMérieux SA, Marcy L'Étoile France) y el Yeast Biochemical Card (YBC) (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) (1, 7).

El algoritmo propuesto para la identificación de *C. guilliermondii* se llevó a cabo mediante el aislamiento primario en CHROMagar Candida (CHROMagar Company, Paris, France) a 37 °C, registrándose a las 48 h el aspecto y el color del desarrollo fúngico. Posteriormente, con las levaduras aisladas del medio cromogénico se realizó el estudio micromorfológico, para lo cual se utilizó agar leche-tween 80 al 1%, que se incubó a 28 °C (5). Se realizaron diariamente observaciones microscópicas con aumentos de 200X y 400X hasta completar las 96 h. Se registró el tamaño y la forma de las levaduras, la presencia de blastoconidios y su disposición en el pseudomicelio (14). Se evaluó también la asimilación de trehalosa y sacarosa mediante tabletas de diagnóstico (Rosco Diagnostica A/S, Dk 2630 Taastrup), como fue descrito para *C. glabrata* (8).

El medio CHROMagar Candida ha sido mencionado por diferentes autores por su utilidad en la identificación de *Candida* (6, 13). El desarrollo en CHROMagar Candida, tanto de *C. glabrata* como de *C. guilliermondii* y de *C. famata*, mostró un color rosado-púrpura que no resultó útil para la diferenciación de estas especies. Este color también es observado en *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Prototheca wickerhamii* y *Cryptococcus neoformans* (6).

La observación microscópica de *C. guilliermondii* a 200X a las 48 h mostró levaduras pequeñas, ovoides y brotantes, de 3 a 5 µm, que no formaron pseudomicelio. Posteriormente se comenzó a observar un conglomerado característico de pseudohifas con disposición radiada, las cuales se encontraban bien desarrolladas a las 96 h de incubación (Figura 1). Las cepas de *C. glabrata* y *C. famata* se mostraron siempre como levaduras pequeñas, brotadas y sin pseudohifas, lo que nos llevó a realizar los ensayos de asimilación de trehalosa y sacarosa. Todos los aislamientos de *C. glabrata* dieron positiva la prueba de utilización de trehalosa y negativa la de sacarosa (8); por el contrario, los aislamientos de *C. guilliermondii* y de *C. famata* fueron positivos para utilización de sacarosa y negativos para utilización de trehalosa (8). La dife-

renciación de las variedades de *C. guilliermondii* es sólo posible con el uso de las tradicionales pruebas de fermentación y de asimilación, que son laboriosas y actualmente sólo se emplean en los laboratorios de referencia (2).

Las identificaciones realizadas fueron validadas mediante el análisis del perfil bioquímico establecido por dos métodos comerciales, el ID32C y el YBC, y resultaron concordantes en el 100% de los casos. Con el primero de los equipos comerciales, la identificación de *C. guilliermondii* mostró que en el 75% de los casos daba como segunda opción a *C. famata*, con porcentajes de confianza inferiores al 10%. Los mismos estudios realizados con el YBC nos permitieron identificar a las 48 h a *C. guilliermondii*, con porcentajes de confianza mayores del 90%, y en el 64% de los casos mostraron como segunda opción a *C. famata*, con una confianza que osciló entre el 1 y el 9%. Estos datos nos indican que los estudios bioquímicos siempre deben estar acompañados de las observaciones micromorfológicas, en especial si se debe diferenciar entre *C. guilliermondii* y *C. famata*.

De acuerdo con nuestro algoritmo (Figura 2), el color rosado-púrpura de las colonias en CHROMagar Candida, la observación de levaduras pequeñas, ovoides y bro-

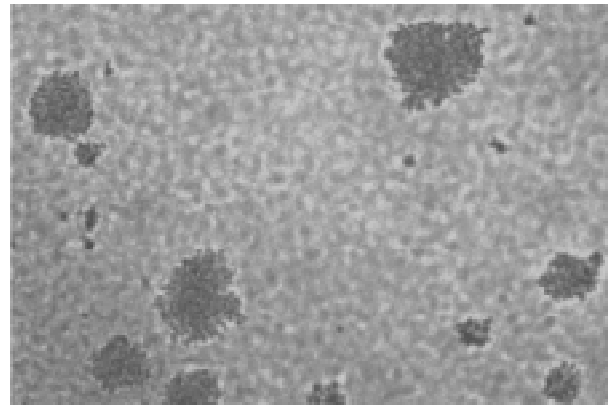


Figura 1. Aspecto microscópico de *C. guilliermondii* sobre agar leche-tween 80 al 1%. Observación a 200X (96 h de incubación a 28 °C).

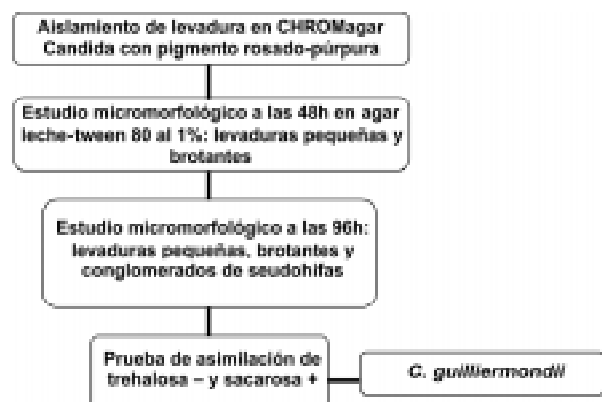


Figura 2. Algoritmo para la identificación de *C. guilliermondii*

tantes, de 3 a 5 µm, que no formaban pseudomicelio a las 48 h para posteriormente (a las 96 h) formar un conglomerado de pseudohifas y el resultado positivo para asimilación de sacarosa y negativo para asimilación de trehalosa nos permitieron concluir que la levadura en estudio se trataba de *C. guilliermondii*.

Agradecimientos: se agradecen los valiosos aportes de los Dres. Ricardo Negroni y C. Iovannitti en la revisión de este trabajo. El trabajo ha sido subvencionado por el proyecto UBACyT M-087.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, *et al.* Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1184-7.
2. Hansen EC, Kurtzman CP. *Pichia*. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors. *The yeast. A taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1998, p. 273-352.
3. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 462-78.
4. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sánchez-Souza A, Palacio A, *et al.* Comparison of susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4 year global evaluation using disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5623-32.
5. Jitaurong S, Klamsiri S, Pataragrorn N. Milk medium for germ tube and chlamidoconidia production by *Candida*. *Mycopathologia* 1993; 123: 95-8.
6. Koehler AP, Chu K, Houang ETS, Cheng AFB. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 422-6.
7. Latouche GN, Daniel HM, Lee OC, Mitchell TG, Sorrel TC, Meyer W. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3171-80.
8. Lopez J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich ACH, Pacot A, *et al.* Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco diagnostic tablets. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1172-4.
9. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, González-Monroy J, López-Martínez R. Case report fungal peritonitis in 15 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Mycoses* 2003; 46: 425-9.
10. Mardani M, Hanna HA, Girgawy E, Raad I. Nosocomial *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 336-7.
11. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-9.
12. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, *et al.* International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3254-9.
13. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58-61.
14. Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and others yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (editors). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., ASM Press, 1995; p. 723-37.
15. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382-402.
16. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,170 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.